

ANALISIS RESIDU KLORPİRIFOS DALAM SAYUR-SAYURAN DENGAN TEKNIK HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

ANALYSIS OF CHLORPYRIFOS RESIDUE IN VEGETABLES BY USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) TECHNIQUE

Aman Sentosa Panggabean

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Mulawarman, Samarinda

Email: amanspanggabean@yahoo.com

ABSTRACT

The research about analysis of chlorpyrifos residue in vegetables by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique has been done. To obtain the optimal measurement results, the measurement performed several important parameters in the chromatographic system was composition of mobile phase, volume injection sample, flow rate and pH eluent. Optimum measurement conditions obtained was mobile phase composition (water : methanol) with 70 : 30, volume injection sample are 5 μ L, flow rate are 0.5mL/menit and pH eluent are 7. The analytical performance that obtained is good showed with the reproducibility value as percentage coefficient variance (% CV) was 0.0664%, limit of detection (LOD) was 0.44 ppm, with a recovery percentage of > 95%. The results obtained showed the HPLC technique can be used for the routine analysis in the determination of chlorpyrifos for the vegetable samples.

Keywords: *Chlorpyrifos, Vegetables, HPLC.*

PENDAHULUAN

Pertambahan jumlah penduduk pada beberapa dekade belakangan ini sangat besar. Hal ini tentunya berdampak dalam penyediaan kebutuhan bahan makanan yang meningkat dari waktu ke waktu. Upaya produksi pangan sering menghadapi kendala serangan hama yang menyebabkan gagal panen atau minimal hasil panen berkurang. Salah satu cara yang terbukti meningkatkan produksi hasil tanaman pangan adalah penggunaan pestisida, namun di sisi lain karena pestisida adalah bahan kimia beracun, pemakaian pestisida berlebihan dapat menjadi sumber pencemar bagi bahan pangan, air dan lingkungan hidup. Residu sejumlah bahan kimia yang ditinggalkan melalui berbagai siklus, langsung atau tidak langsung, dapat sampai ke manusia, terhirup melalui pernafasan, dan masuk ke saluran pencernaan bersama makanan dan air minum [1].

Dewasa ini jenis pestisida yang paling banyak beredar dan digunakan dalam pengendalian hama penyakit tanaman secara terpadu adalah jenis organofosfat dan karbamat. Senyawa organofosfat dan karbamat bersifat menghambat enzim *cholinesterase*, yaitu enzim yang berperan dalam penerusan rangsangan

syaraf. Peracunan dapat terjadi karena gangguan dalam fungsi susunan syaraf yang akan menyebabkan kematian atau dapat pulih kembali. Umur residu dari organofosfat dan karbamat ini tidak berlangsung lama sehingga peracunan kronis terhadap lingkungan cenderung tidak terjadi karena faktor-faktor lingkungan mudah menguraikannya menjadi komponen yang tidak beracun [2][3].

Klorpirifos (*o,o*-diethyl-*o*-3,5,6-trichloropyridin-2-yl-phosphorothioate) adalah kristal organofosfat insektisida yang menghambat *acetylcholinesterase* dan digunakan untuk mengontrol hama serangga. Klorpirifos ini cukup beracun dan paparan kronis dapat menyebabkan efek neurologis, gangguan pertumbuhan, dan gangguan autoimun. Klorpirifos adalah salah satu dari sekitar 100 insektisida organofosfat yang tersebar luas di pasaran saat ini dan digunakan untuk membunuh hama serangga dengan mengganggu sistem saraf mereka. Klorpirifos memiliki keuntungan lebih dari produk lainnya yaitu efektif terhadap berbagai tanaman pemakan serangga hama [4].

Jumlah Klorpirifos dalam bahan makanan terutama dalam sayur-sayuran harus diketahui, karena senyawa ini sangat berbahaya bagi

kesehatan manusia yang mengkonsumsinya. Untuk itu diperlukan suatu metode analisis yang sensitif dan selektif yang dapat mendeteksi senyawa klorpirifos dan dapat digunakan secara rutin dan berbiaya murah. Salah satu teknik instrumentasi yang sensitif dan selektif untuk analisis senyawa organik dalam level renik adalah *High Performance Liquid chromatography* (HPLC) [5][6].

Pada penelitian ini telah dilakukan beberapa optimasi prosedur pengukuran untuk menentukan residu klorpirifos dalam sampel sayur-sayuran yang meliputi pengaruh komposisi eluen, volume injeksi, laju alir eluen, pH eluen dan penentuan kinerja analitik yang meliputi kebolehlungan, linearitas, batas deteksi dan pengaruh matriks, yang kemudian dapat diaplikasikan untuk menentukan kadar residu klorpirifos dalam sampel sayur-sayuran.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat instrument *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) Agilen 1100 Series kolom Shim-Pack VP-ODS (i.d. 4,6 x 250 mm) dan detektor UV, pompa vakum, pH-meter, labu ukur, pipet volume, beaker glass dan kertas saring whatman No.42.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan standar insektisida klorpirifos, buffer fosfat, metanol dan aquabides, asam asetat, NH_4OH 1M, diklorometan, sayur-sayuran yaitu kembang kol, sawi putih dan kubis.

Prosedur Penelitian

Persiapan Alat HPLC

Kolom yang digunakan adalah Shim-Pack VP-ODS (4,6 x 250 mm). HPLC menggunakan detektor UV-Visible pada panjang gelombang 230 nm dengan sensitifitas 1,000 AUFS. Pompa menggunakan mode aliran tetap dengan sistem elusi gradien. Setelah alat HPLC dihidupkan, maka pompa dijalankan dengan fase gerak dibiarkan mengalir selama ± 30 menit sampai diperoleh *base line* yang menandakan sistem telah stabil.

Optimasi Parameter Pengukuran HPLC

Penentuan Fasa Gerak Air:Metanol

Sebanyak 5 μL larutan standar diinjeksikan ke dalam kolom. Fasa gerak yang digunakan adalah metanol : air dengan komposisi perbandingan 0:100, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50. Ditentukan waktu retensi dan luas areanya.

Penentuan Volume injeksi

Diinjeksikan larutan standar dengan variasi volume yaitu 5- 20 μL pada komposisi fasa gerak yang optimum. Ditentukan waktu retensi dan luas areanya.

Penentuan Laju Alir Fasa Gerak

Larutan standar diinjeksikan ke dalam injektor HPLC menggunakan komposisi fasa gerak metanol : air dan volume injeksi optimum, dengan memvariasikan laju alir 0,3 - 1 mL/menit. Ditentukan waktu retensi dan luas areanya.

Penentuan pH Fasa Gerak

Sebanyak 5 μL larutan standar diinjeksikan ke dalam injektor pada komposisi fasa gerak optimum yang diatur pada berbagai variasi pH yaitu 3-8, pada volume sampel dan laju alir optimum yang diperoleh pada penelitian sebelumnya. Ditentukan waktu retensi dan luas areanya.

Penentuan Kinerja Analitik

Kebolehlungan

Sebanyak 5 μL larutan standar 5 ppm diinjeksikan ke dalam kolom menggunakan fasa gerak dan laju alir yang optimum, diulangi sebanyak 7 kali, kemudian dicatat luas puncaknya dan dihitung faktor kapasitasnya.

Linearitas dan Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi dibuat dengan memvariasikan konsentrasi larutan standar 0 - 25 ppm, kemudian masing-masing larutan standar diinjeksikan sebanyak 5 μL ke dalam kolom pada kondisi optimum. Pendeteksian menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 230 nm. Direkam kromatogram dan dibuat kurva kalibrasi konsentrasi larutan standar-vs-luas puncak, lalu dihitung persamaan regresi dan koefisien korelasinya.

Limit Deteksi

Dalam penelitian ini LOD ditentukan dengan mengukur harga luas area dari konsentrasi klorpirifos terkecil yang masih dapat ditentukan dan dibedakan dari luas area yang diberikan oleh blanko dengan beberapa kali pengukuran. Limit deteksi dinyatakan sebagai perbandingan luas area standar (S) terhadap luas area blanko (N) atau $S/N=3$ [7][8].

Pengaruh Matriks (% Recovery)

Uji perolehan kembali dilakukan dengan metode spike. Pada tahap ini dipersiapkan larutan uji klorpirifos 5 ppm dan diencerkan dengan larutan sampel sayur sampai garis tanda. Larutan uji tersebut selanjutnya diinjeksikan ke injektor HPLC dan dihitung persentase perolehan kembalinya.

Penentuan Konsentrasi Klorpirifos dalam Sampel

Preparasi Sampel

Sayur kembang kol, sawi putih dan kubis dikeringkan, lalu dihaluskan dengan blender. Ditimbang sebanyak 20 gram dan tambahkan diklorometan sebanyak 100 mL, dimaserasi selama 48 jam. Disaring, lalu dimasukkan ke dalam corong pisah. Diekstraksi selama 60 menit, fraksi diklorometan diambil dan kemudian dimasukkan ke dalam gelas vial [5].

Penetapan Kadar Residu Klorpirifos dalam Sampel

Sampel diambil 25 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL ditambahkan dengan eluen sampai tanda tera. Di kocok dan di saring, kemudian diinjeksikan ke dalam sistem HPLC melalui injektor. Direkam kromatogram dan di catat luas puncak. Kadarnya dihitung dengan mensubstitusikan luas puncak ke dalam persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi.

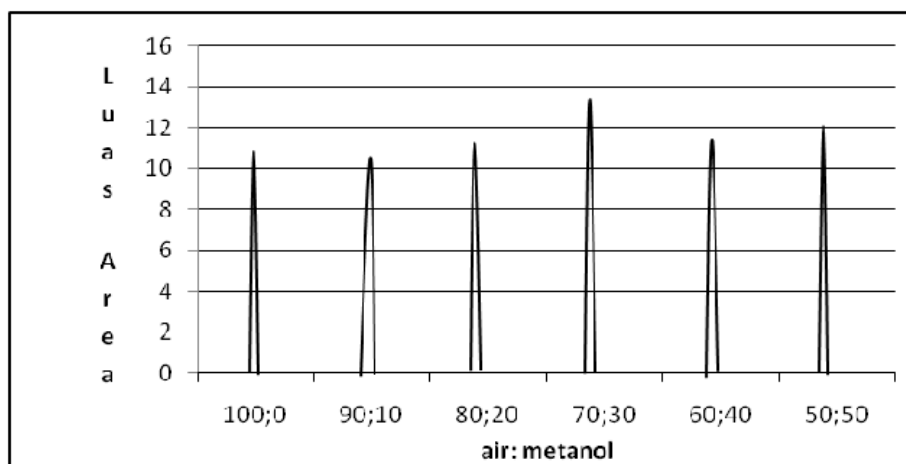
HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk mendapatkan kondisi pengukuran yang optimum HPLC yang digunakan dalam penentuan klorpirifos dalam sayur-sayuran, maka dilakukan pengukuran beberapa optimasi parameter kromatografik kemudian dilanjutkan dengan penentuan kinerja analitiknya.

Optimasi Parameter Pengukuran HPLC

Pengaruh Komposisi Fasa Gerak Metanol : Air

Penelitian ini menggunakan kromatografi cairan fasa terbalik (*reversed phase chromatography*, RPC), yaitu fasa gerak yang digunakan lebih polar bila dibandingkan dengan fasa diam yang bersifat nonpolar [9]. Penentuan hasil optimasi berdasarkan luas puncak kromatogram, karena luas puncak merupakan parameter yang lebih akurat untuk pengukuran kuantitatif [6]. Hasil pengukuran pengaruh komposisi fasa gerak dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh komposisi fasa gerak air : metanol

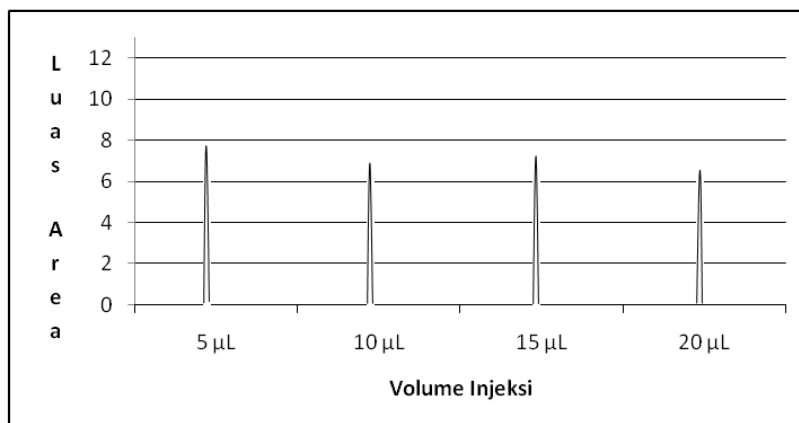
Berdasarkan Gambar 1. pengukuran luas area paling besar didapatkan pada komposisi fasa gerak (air:metanol) 70:30, dibandingkan perbandingan komposisi yang lainnya. Pada penambahan metanol akan menurunkan kepolaran fasa gerak sehingga proses elusi terjadi lebih cepat, oleh karena itu waktu retensi menjadi singkat [6][10]. Maka, dapat disimpulkan bahwa pada komposisi fasa gerak air:metanol dengan perbandingan 70:30 adalah kondisi yang paling optimum untuk analisa klorpirifos.

Pengaruh Volume Injeksi Sampel

Dalam pengukuran parameter ini digunakan komposisi fasa gerak yang optimum hasil

pengukuran sebelumnya, yaitu air:metanol dengan perbandingan 70:30. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Gambar 2.

Pengukuran dengan nilai luas area paling tinggi diperoleh pada volume injeksi sampel 5 μ L. Hal ini disebabkan karena suatu kolom memiliki kapasitas volume injeksi sampel tertentu, jika volume sampel yang diinjeksikan melebihi kapasitas, maka pendeteksian suatu sampel tidak dapat maksimal [6]. Jadi dapat disimpulkan bahwa kolom yang digunakan hanya dapat menganalisa klorpirifos dengan volume injeksi sampel yang optimum yaitu 5 μ L.

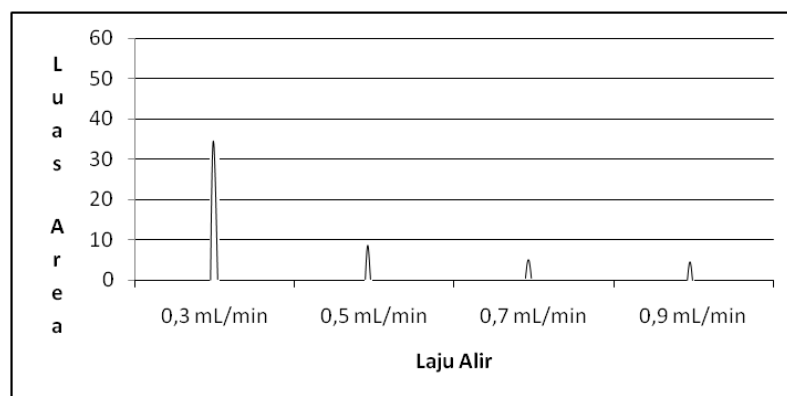


Gambar 2. Pengaruh volume injeksi sampel

Pengaruh Laju Alir Fasa Gerak

Dalam pengukuran parameter ini digunakan komposisi fasa gerak dan volume injeksi sampel yang optimum hasil pengukuran sebelumnya,

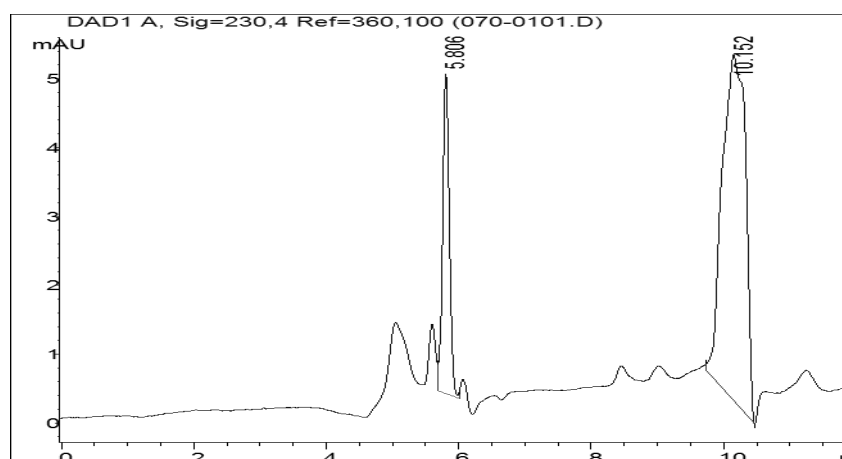
yaitu air:metanol dengan perbandingan 70:30 dan volume injeksi sampel 5 µL. Hasil Pengukuran dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengaruh Laju alir fasa gerak

Berdasarkan Gambar 3. diperoleh pada saat digunakan laju alir 0,3 mL/menit, kromatogram yang dihasilkan memiliki luas area yang lebih besar tetapi bentuk kromatogramnya tidak simetris, sehingga tidak dapat digunakan untuk analisa karena salah satu syarat penentuan yang

baik memiliki waktu retensi yang cepat dan hasil yang akurat. Pada pengukuran ini dipilih laju alir fasa gerak 0,5 mL/menit, karena menghasilkan kromatogram yang memiliki luas area yang paling baik dan waktu retensi yang diperoleh, stabil pada 3,509 menit.



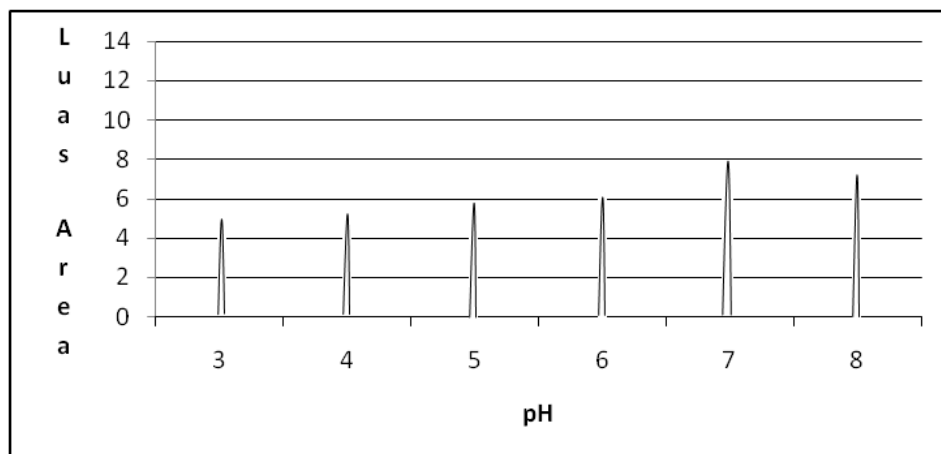
Gambar 4. Kromatogram dengan laju alir 0,3 mL/menit

Pengaruh pH Fase Gerak

Dalam pengukuran parameter ini digunakan komposisi fasa gerak, volume injeksi sampel dan laju alir fasa gerak yang optimum hasil pengukuran sebelumnya, yaitu air:metanol dengan perbandingan 70:30, volume injeksi sampel sebanyak 5 μ L dan laju alir fasa gerak sebesar 0,5 mL/menit.

Fasa gerak yang digunakan diatur pada variasi pH 3 - 8. Jika pH < 3, ikatan silika dapat

terputus (terhidrolisis), dan jika pH > 8, silika akan larut, karena silika dapat larut dalam suasana basa [6]. Pada Gambar 5. dapat dilihat bahwa perbedaan pH fasa gerak memberikan perubahan terhadap luas area kromatogram pada larutan standar klorpirifos. Luas area kromatogram yang paling besar dihasilkan pada fasa gerak pH 7 dibandingkan dengan fase gerak pH lainnya, sehingga dapat disimpulkan pH 7 adalah pH optimum untuk analisa klorpirifos



Gambar 5. Pengaruh pH fasa gerak

Dari hasil optimasi parameter HPLC untuk penetapan dapat dilihat pada Tabel 1.

Penentuan Kinerja Analitik

Setelah diperoleh hasil dari optimasi parameter kromatografik HPLC, kemudian

dilanjutkan dengan penentuan kinerja analitik yang terdiri dari kebolehulangan, batas deteksi (LOD), linieritas, persentasi koefisien variansi (% KV) dan persentase perolehan kembali (% recovery).

Tabel 1. Hasil pengukuran optimasi parameter kromatografik pada penentuan klorpirifos dengan HPLC

Parameter	Hasil Pengukuran
Kolom	: Si-C ₁₈ Shim-Pack VP-ODS (4,6 x 250 mm)
Komposisi Fasa Gerak	: air : metanol (70:30)
Volume Injeksi Sampel	: 5 μ L
Laju alir fasa gerak	: 0,5 mL/menit
pH Fasa Gerak	: pH 7 (buffer fosfat)
Panjang gelombang	: 230 nm
Detektor	: UV

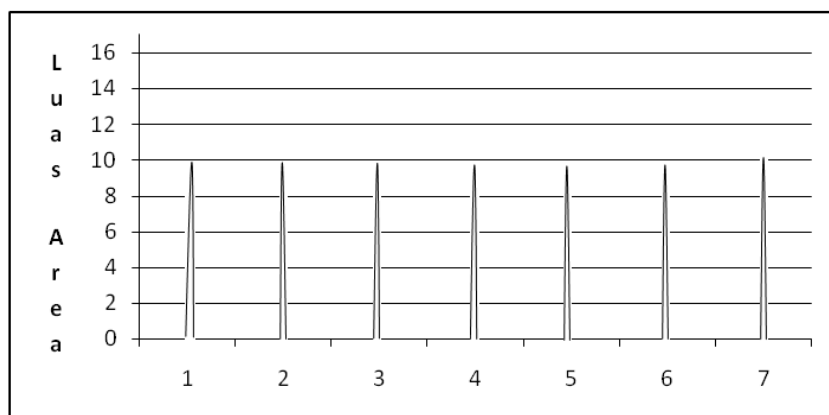
Kebolehulangan

Kebolehulangan merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian/ kedekatan hasil antara hasil uji analisis yang dianalisis dengan cara yang sama. Pada penelitian ini, presisi ditetapkan berdasarkan keterulangan luas area

kromatogram hasil analisa dengan tujuh kali pengulangan pada larutan standar. Perbedaan absolut dari data hasil analisa diharapkan berada dalam kisaran nilai kepercayaan 95% atau nilai relatif standar deviasi lebih kecil dari 5%. Untuk kriteria presisi dinyatakan dengan koefisien

variasi yaitu sebesar 2% atau kurang untuk konsentrasi larutan standar dengan konsentrasi

ppm (mg/L) [7]. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Gambar 6.



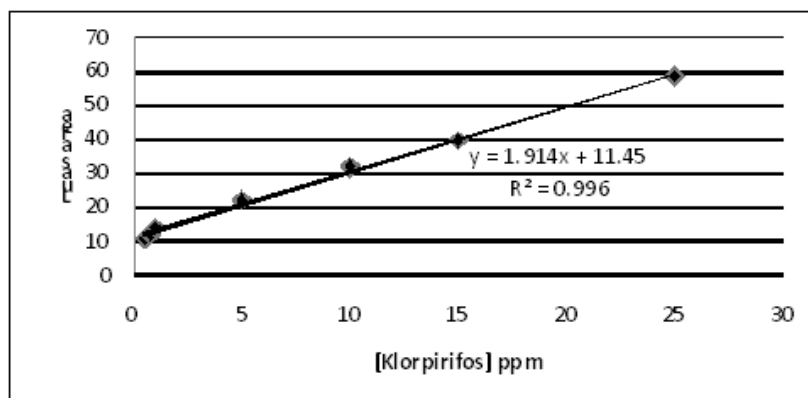
Gambar 6. Pengukuran kebolehulangan larutan standar klorpirifos 0,5 ppm

Kebolehulangan ditunjukkan dengan % KV (koefisien variansi). Hasil pengukuran ditunjukkan pada Gambar 6. Dari hasil penelitian yang diperoleh % KV untuk penentuan klorpirifos 0,5 ppm adalah 0.0664%. Dari hasil dapat dikatakan bahwa sistem operasional alat dan analisis memiliki nilai kebolehulangan yang baik terhadap metode dengan respon yang relatif

konstan, sehingga hasil pengukuran memiliki nilai presisi yang memenuhi persyaratan.

Penentuan Kurva Kalibrasi (Linieritas)

Penentuan linieritas pada pembuatan kurva kalibrasi klorpirifos dilakukan pada kondisi optimum yang diperoleh pada optimasi parameter HPLC.



Gambar 7. Kurva kalibrasi larutan standar klorpirifos

Hasil pengukuran menunjukkan persamaan garis regresi $y = 1,914x + 11,45$ dengan nilai koefisien korelasi $R^2 = 0,996$. Nilai regresi yang baik adalah $> 0,99$ [7][8], maka nilai ini telah memenuhi syarat digunakan untuk pengukuran analisis rutin.

Limit Deteksi (*Limit of Detection, LOD*)

Ketidakpastian terhadap analisis akibat pengukuran contoh uji yang sangat rendah, dapat teratasi dengan menentukan limit deteksi. Limit deteksi berguna dalam memastikan suatu respon yang ditimbulkan suatu analisis [8].

Penentuan limit deteksi pada percobaan ini berdasarkan pada pengukuran larutan standar

sebanyak 7 kali dan ditentukan simpangan baku dari data yang ada sehingga dapat diketahui nilai deteksi dengan rumus yang ada. Dari hasil penelitian yang dilakukan untuk penentuan klorpirifos dengan metode HPLC diperoleh batas deteksi klorpirifos sebesar 0,44 ppm.

Perolehan kembali (% *Recovery*)

Salah satu syarat metode analisis yang baik adalah memiliki ketelitian atau akurasi yang tinggi. Parameter uji yang digunakan untuk menilai ukuran akurasi pada penelitian ini adalah parameter persentase perolehan kembali (% *recovery*). Pada penelitian ini, pengukuran persentase perolehan kembali dilakukan dengan

metode *spike*, dengan tujuan untuk melihat pengaruh matriks sampel berupa sayur-sayuran pada pengukuran konsentrasi klorpirifos.

Hasil pengukuran persentase perolehan kembali yang dihasilkan untuk penentuan

klorpirifos dalam sayur-sayuran untuk 3 sampel berbeda, antara lain sampel Kubis sebesar 96%, sampel Kembang kol sebesar 103%, dan sampel sawi putih sebesar 98%.

Tabel 2. Konsentrasi klorpirifos dalam sayur-sayuran yang telah dikeringkan

No.	Sampel	[Klorpirifos] µg/kg
1.	Kubis	0,131 ± 0,008
2.	Kembang Kol	0,013 ± 0,005
3.	Sawi Putih	0,109 ± 0,009

Penentuan Konsentrasi Klorpirifos dalam Sayur-sayuran

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan konsentrasi klorpirifos dalam sayur-sayuran dengan menggunakan HPLC yang sebelumnya dioptimasi parameter kromatografiknya yang dilanjutkan dengan penentuan kinerja analitik sehingga diperoleh kondisi yang optimal untuk analisis. Kadar klorpirifos dari masing-masing sampel dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa residu klorpirifos dapat terdeteksi dalam sayur-sayuran, sehingga perlu menjadi pertimbangan bagi para konsumen dan pihak berwenang tentang keberadaan dan penggunaan senyawa ini.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa teknik HPLC dapat digunakan untuk menentukan residu klorpirifos dalam sayur-sayuran dengan ketepatan dan keakuratan yang tinggi, sehingga teknik HPLC ini layak digunakan untuk analisis rutin senyawa klorpirifos dalam berbagai sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Atmawidjaja, S, Daryono, H.T, dan Rudiyanto. 2004. Pengaruh Perlakuan Terhadap Kadar Residu Pestisida Metidation Pada Tomat. *Acta Pharmaceutica Indonesia*. Hal. 85-92.
- [2] Erin, M. B, Hertz-Picciotto, I, and Beaumont, J.J. 2001. Fetal Deaths Linked to Living Close to Agricultural Pesticide Use During Weeks 3-8 of Pregnancy, *Epidemiology*. **52**. pp. 105 – 109.
- [3] Schreinemachers, D. M. 2003. Birth Defects Higher in Babies Born to Families Living Near Farming Areas Using Pesticides, *Environmental Health Perspectives*. **111(9)**. pp. 1259-1264.
- [4] Sastroutomo, S.S. 1992. *Pestisida: Dasar Dasar dan Dampak Penggunaannya*, Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- [5] Islam, S, Afrin, N, Hossain, M.S, Nahar, N, Mosihuzzaman, M dan Mamun, M.I.R. 2009. Application of High Performance Liquid Chromatography to the Analysis of Pesticide Residues in Eggplants. *J. Applied Sci*. pp. 325-329.
- [6] Panggabean, A. S., Amran, M.B., Buchari and Achmad, S. 2009. Speciation of Organotin Compounds with Ion Pair-Reversed Phase Chromatography Technique. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. **4(2)**. pp 215-225.
- [7] Miller. J.C dan J. N Miller, 1991. *Statistika Untuk Kimia Analitik*. Edisi Kedua. Penerbit ITB. Bandung.
- [8] Panggabean, A.S., Subur P. Pasaribu, Bohari, Nurhasanah 2014. *Preconcentration of Chromium(VI) at Trace Levels Using Acid Alumina Resin With Column Method* Indo. J. of Chem. **14(1)**. pp. 51-56
- [9] Snyder, L.R., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L. 1997. *Practical HPLC Method Development*. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- [10] Hayun, H. Y dan Citra N. A. 2004. Penetapan Kadar sakarin, Asam Benzoat, Asam Sorbat, Kofeina, dan Aspartam didalam beberapa Minuman Ringan Bersoda secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol I, No 3 Hal 148-159.